

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Příprava vybraných rekombinantních proteinů viru Aichi a dalších kobuvirů
Expression and purification of recombinant proteins of human Aichi virus and other
kobuviruses

Bakalářská práce
Tomáš Ludvík

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

podpis:

Abstrakt

Virová 2A^{pro} zastává mnoho důležitých funkcí v životním cyklu viru. Jedná se o proteasu, jež se podílí na štěpení virového polyproteinu v úseku VP1/2A. Struktura proteinu obsahuje tzv. aktivní místo, díky kterému dokáže protein vázat různé substráty v hostitelské buňce, což je esenciální pro virovou infekci. Pomocí 2A^{pro} dokáže virus obejít imunitní odpověď hostitele a zastavit produkci klíčových hostitelských proteinů. Proto je proteasa 2A^{pro} vhodný cíl pro zásah antivirotiky. V rámci této práce byly připraveny dva rekombinantní proteiny 2A^{pro} z Aichi viru a Coxsackie viru B3. Jedná se o viry z rodiny *Picornaviridae*, které patří mezi lidské patogeny, jež v některých případech způsobují závažná onemocnění. Aichi virus je původcem gastroenteritidy a Coxsackie virus B3 v nejhorších případech způsobuje dilatační kardiomyopatii. Kardiomyopatie vede ke špatné funkci srdce důsledkem jeho rozšíření, čímž může dojít až k srdečnímu selhání.

Klíčová slova: rekombinantní proteiny, 2A^{pro}, Aichi virus, Coxsackie B3 virus

Abstract

Viral 2A^{pro} plays many important functions in the life cycle of virus. It is protease that is involved in the cleavage of the viral polyprotein in the VP1/2A region. The structure of protein contains active site, thanks to this the protein is able to bind various substrates in the host cell, which is essential for viral infection. With the help of 2A^{pro}, the virus can bypass the host immune response and stop the production of key host proteins. Therefore, 2A^{pro} is suitable target for antiviral intervention. In this work were prepared two recombinant proteins from Aichi virus and Coxsackievirus B3. These are viruses of the family *Picornaviridae*, which belong among the human pathogens that in some cases cause serious diseases. Aichi virus is the cause of gastroenteritis and Coxsackievirus B3 in the worst cases causes dilated cardiomyopathy. Cardiomyopathy leads to poor heart function due to its enlargement and can lead to heart failure. (In Czech)

Key words: recombinant proteins, 2A^{pro}, Aichi virus, Coxsackievirus B3

Poděkování

Na úvod bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D. za jeho cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi po dobu celé práce věnoval. Dále bych rád poděkoval všem členům laboratoře za jejich vstřícnost, ochotu pomoci během práce a také za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

1	Teoretický úvod.....	9
1.1	<i>Picornaviridae</i>	9
1.1.1	Organizace genomu	10
1.1.2	Kapsida	11
1.1.3	Tropismus	12
1.1.4	Vstup do hostitelské buňky	12
1.1.5	Translace.....	13
1.1.6	Replikace.....	14
1.2	Kobuviry	15
1.2.1	Genom kobuvirů	16
1.2.2	Aichi virus 1 (AiV-1).....	16
1.3	Enteroviry.....	17
1.3.1	Coxsackie virus B3 (CVB3)	17
1.4	Protein 2A ^{pro}	18
1.4.1	Struktura chymotrypsin 2A ^{pro}	18
1.4.2	Funkce chymotrypsin 2A ^{pro}	19
1.4.3	Funkce 2A rodu parechovirů	21
2	Cíl práce	22
3	Materiály a metody.....	23
3.1	Materiály.....	23
3.1.1	Přístroje	23
3.1.2	Chemikálie	24
3.1.3	Roztoky, pufrý a média	25
3.1.4	Složení gelu na DNA.....	26
3.1.5	Složení gelů na SDS-PAGE	26
3.1.6	Enzymy.....	26
3.1.7	Primery	27
3.1.8	Bakteriální kmeny	27
3.2	Metody.....	28
3.2.1	Polymerasová řetězová reakce (PCR)	28
3.2.2	Horizontální agarosová elektroforesa	29
3.2.3	Purifikace	29
3.2.4	Štěpení produktů PCR a plasmidů	29
3.2.5	Ligační směs.....	30

3.2.6	Transformace bakteriemi <i>E. Coli</i> DH5 α	30
3.2.7	PCR z kolonií a minipreparace DNA.....	31
3.2.8	Sekvenace plasmidové DNA.....	32
3.2.9	Exprese rekombinantních proteinů v <i>E. Coli</i> BL21 Star	33
3.2.10	Centrifugace a lyse buněk.....	33
3.2.11	Afinitní (chelatační) chromatografie	33
3.2.12	Dialýsa	34
3.2.13	Štěpení TEV proteasou a Ulp1 proteasou.....	34
3.2.14	Koncentrování proteinu	34
3.2.15	Gelová permeační chromatografie.....	35
3.2.16	Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS (SDS-PAGE)	35
4	Výsledky	36
4.1	Příprava expresního plasmidu, exprese a purifikace rekombinantního proteinu 2A AiV.....	36
4.2	Příprava expresního plasmidu, exprese a purifikace rekombinantního proteinu 2A ^{pro} CVB3	40
5	Diskuse.....	44
6	Závěr	45

Seznam zkratek

AiV-1	Aichi virus 1
Asp	Asparagová kyselina (z angl. aspartic acid)
ATP	Adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
Bid	z angl. BH3 interacting-domain death agonist
CD155	z angl. cluster of differentiation 155
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)
CRE	z angl. cis-acting replication element
CVB3	Coxsackievirus B3
Cys	Cystein (z angl. cysteine)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dsDNA	Dvouvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
dsRNA	Dvouvláknová RNA (z angl. double-stranded RNA)
His	Histidin (z angl. histidine)
IgG superfamily	Imunoglobulinová G rodina (z angl. immunoglobulin G superfamily)
IFN	Interferony (z angl. interferons)
IFNAR1	z angl. IFN alpha and beta receptor subunit 1
IRES	Vnitřní místo pro vstup ribosomu (z angl. internal ribosome entry site)
L protein	vedoucí protein (z angl. leader protein)
MDA5/MAVS	z angl. melanoma differentiation-associated gene 5/mitochondrial antiviral-signaling protein
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
NPC	Komplex jaderných pórů (z angl. nuclear pore complex)
Nups	Nukleoporiny (z angl. nucleoporins)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
pH	Potenciál vodíku (z angl. potential of hydrogen)

RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RdRp	RNA-dependentní RNA polymerasa (z angl. RNA-dependent RNA polymerase)
SP1	z angl. specificity protein 1
ssDNA	Jednovláknová DNA (z angl. single-stranded DNA)
SREBP1	z angl. sterol regulatory element-binding protein 1
ssRNA	Jednovláknová RNA (z angl. single-stranded RNA)
STAT	z angl. signal transducer and activator of transcription
TDP2	z angl. 5'-tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2
TEVpro	Proteasa viru tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus protease)
UTP	Uridintrifosfát (z angl. uridine-5'-triphosphate)
UTR	Nepřekládaná oblast (z angl. untranslated region)
VPg	z angl. viral protein genome linked

1 Teoretický úvod

Viry jsou obligátně vnitrobuněční parazité závislí na svém hostiteli, a to z hlediska rozmnožování. Mohou obsahovat genom ve formě DNA nebo RNA. Pro jednu virovou částici se obvykle užívá pojem virion. Virion je složen z nově syntetizovaných virových proteinů a nukleových kyselin, případně i lipidů u obalených virů. Nové viriony následně infikují další buňky v hostiteli a spouští tak infekční cyklus [1]. Poté, co vir vnikne do hostitelské buňky, potřebuje syntetizovat proteiny procesem zvaným translace a nukleovou kyselinu procesem zvaným replikace. Pořadí těchto procesů se může lišit mezi různými rodinami virů. K syntéze potřebují energii ve formě ATP, stavební materiály (aminokyseliny a nukleotidy) a další vybavení (např. ribosom), které virům chybí a poskytuje ho právě hostitel [2].

Virový genom je chráněn proteinovým obalem zvaným kapsida [3]. Proteiny, ze kterých se skládá kapsida, nazýváme strukturální proteiny. Dále virus produkuje i nestrukturální proteiny, jež mohou mít enzymatickou funkci (např. proteasy, reverzní transkriptasy) nebo sloužit jako výbava pro replikaci, může se jednat o polymerasy nebo primery. Kromě kapsidy mohou viry obsahovat vnější obal – lipidovou membránu (tzv. obálku). Tato membrána chrání nukleokapsid (nukleovou kyselinu a kapsidu) před vnějším prostředím a slouží i k interakci s hostitelskými buňkami. Tímto jsou viry rozlišovány na obalené a neobalené. Hlavní rozdělení virů je na základě nukleové kyseliny, která může být buď jednovláknová (ss, z angl. single-strand) nebo dvouvláknová (ds, z angl. double-strand). Celkem čtyři kategorie virů: dsDNA, ssDNA, dsRNA a ssRNA. Kategorii ssRNA virů ještě dále rozdělujeme na základě polarity řetězce na kódující (+) a nekódující (–) viry.

1.1 Picornaviridae

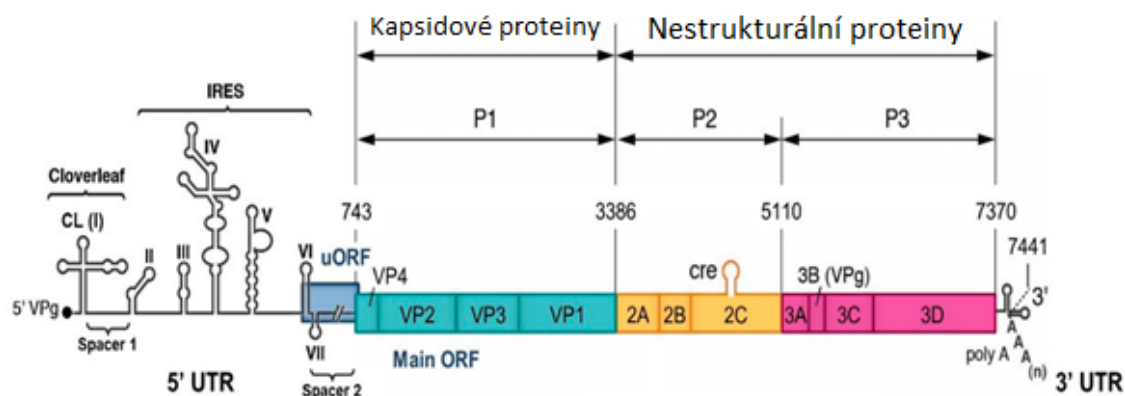
Jedná se o rozmanitou skupinu malých kódujících ssRNA virů, které zahrnují několik významných lidských a zvířecích patogenů. Kapsida má ikosahedrální strukturu o průměru 25-30 nm. Virový genom je kódující a slouží tedy rovněž jako mRNA [3], [4]. Pikornaviry patří mezi neobalené viry, tudíž postrádají vnější obal [5]. Jsou spojeny s onemocněním řady orgánů, např. trávicí soustavy, dýchacích cest, neuronálních tkání a svalů. Jedny z hlavních zástupců infikujících trávicí soustavu představují enteroviry.

Mezi další zástupce řadíme rhinoviry (běžná rýma, nachlazení), polioviry (dětská obrna), virus hepatitidy A nebo virus slintavky a kulhavky (FMDV, z angl. foot and mouth disease virus) [6]. Objektem mnoha výzkumů byly polioviry, jenž slouží jako modelové viry pro celou rodinu *Picornaviridae*. Důvodem jejich volby bylo jimi způsobované závažné onemocnění, kdy se infekce šíří do centrální nervové soustavy, což může vyústit v meningitidu, encefalitidu nebo paralytickou poliomyelitidu (způsobující ochrnutí končetin a dýchacích svalů) [3].

1.1.1 Organizace genomu

Velikost genomu se pohybuje v rozsahu od 6,7 kb do 10,1 kb. Uprostřed genomu se nachází otevřený čtecí rámec (ORF, z angl. open reading frame), který kóduje jeden dlouhý polyprotein [7]. 5' konec začíná malým proteinem zvaným VPg (z angl. viral protein genom linked). Protein se váže přes hydroxylovou skupinu tyrosinu na genom. Po VPg následuje tzv. 5' nepřekládaná oblast (5' UTR, z angl. 5' untranslated region), jež tvoří šest domén. První doménou je „clover-leaf“ struktura a následujících pět domén tvoří tzv. vnitřní místo pro vstup ribosomu (IRES, z angl. internal ribosome entry site), jež funguje jako hlavní vstup pro ribosom, aby mohla být zahájena translace. Na druhém konci genomu podobně jako na začátku se nachází 3' nepřekládaná oblast (3' UTR, z angl. 3' untranslated region), která je polyadenylována (viz obr. 1, str. 11) [3], [6].

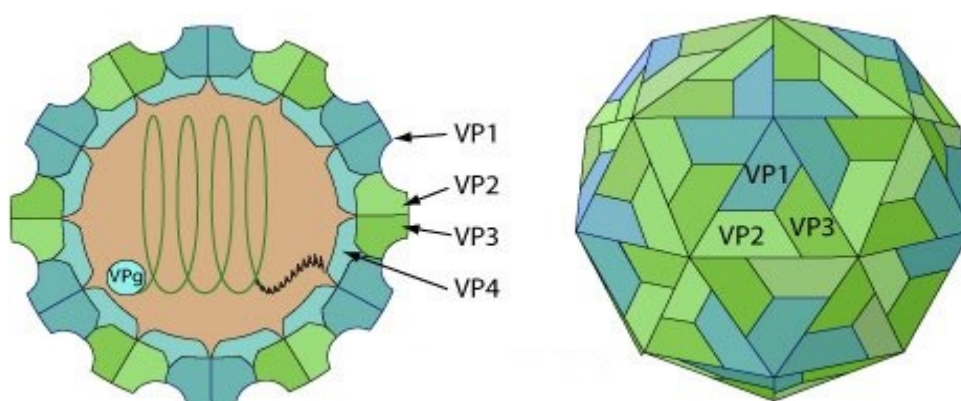
Translací vzniká jeden dlouhý polyproteinový prekurzor, jenž se dále štěpí na strukturální proteiny (odvozené z P1 regionu genomu) a nestrukturální proteiny (odvozené z P2 a P3 regionu genomu) [5]. Polyprotein štěpí specifické proteasy, které se nachází uvnitř polyproteinu. Po štěpení vznikají meziprodukty, jako např. 3CD je neštěpený prekurzor pro vznik proteinů 3C^{pro} a 3D^{pol}. Mezi hlavní proteasy patří 2A protein a 3C protein. Replikaci virové RNA zajišťují proteiny odvozené z 2P a 3P regionu polyproteinu. Především se jedná o 3D polymerasu a 2C ATPasu, jež jsou nezbytné k replikaci virového genomu. Produkce malého proteinu VPg vzniká štěpením prekurzoru 3AB a zastává funkci primeru pro syntézu plus i minus vlákna.



Obrázek 1. Struktura virového genomu Polioviru typu 1 (PV1). Vidíme zde tři regiony (P1, P2, P3), kde jeden region kóduje strukturální proteiny a zbylé dva regiony kódují nestrukturální proteiny. Na 5' UTR konci je místo pro navázání ribosomu – IRES, druhý konec RNA genomu je polyadenylován. Uprostřed genomu se nachází cre element, který má důležitou funkci při syntéze pozitivních vláken. Převzato a upraveno z [8].

1.1.2 Kapsida

Viriony představují neobalené viry s ikosahedrální symetrií kapsidy. Kapsida je složena ze 180 proteinů (60 kopií VP1, VP2 a VP3). Čtvrtý strukturální protein, VP4, se nachází uvnitř kapsidy (viz obr. 2) [9]. Tyto zmíněné proteiny jsou produkovány postupným štěpením polyproteinu. Po druhém štěpení dochází ke skládání do protomeru, který sestává ze tří strukturálních proteinů – VP0 (prekurzor pro VP4 a VP2), VP1 a VP3. Tyto protomery se následně shlukují do prázdné kapsidy a po vložení genomu vzniká provirion (neinfekční virová částice). Jakmile se provirion uvolní z buňky dochází k tzv. maturačnímu štěpení VP0 a virion se stane infekčním [2].



Obrázek 2. Struktura pikornavirů. Uvnitř kapsidy se nachází protein VP4. Vnější stranu kapsidy tvoří proteiny VP1, VP2 a VP3. Převzato z [10].

1.1.3 Tropismus

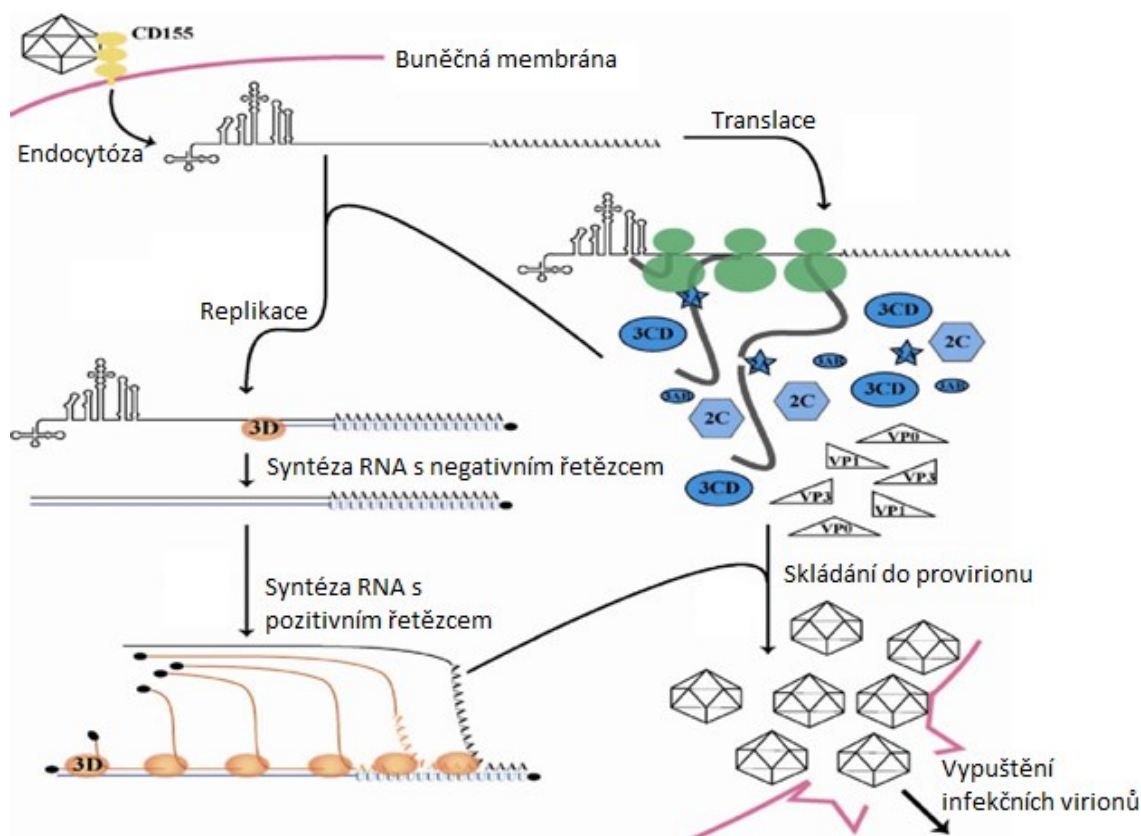
Tropismus je schopnost viru napadat konkrétní hostitelské buňky [11]. Viry tvoří velmi rozmanitou a hojnou skupinou patogenů na Zemi, žijí zde miliony let a neustále se vyvíjejí. První cestu virového tropismu představuje cesta infekce, kdy virus získá přístup ke konkrétní hostitelské tkáni. Jinými slovy každý vir napadá jinou tkáň, např. virus chřipky napadá buňky dýchacího traktu, vzteklna pouze nervovou tkáň. Tato specifita viru je dána receptory na povrchu hostitelských buněk, na které se virus váže.

Téměř všechny pikornaviry se vážou na buněčné proteiny z tzv. IgG superfamily [6]. Příkladem může být receptor pro polioviry CD155, jenž se nachází pouze na buňkách lidí a vyšších primátů. Z tohoto důvodu jsou polioviry považovány za přísně lidské patogeny.

1.1.4 Vstup do hostitelské buňky

Vir po navázání na receptor vstupuje do hostitelské buňky [3]. Pikornaviry mají několik způsobů, jak virový genom dopraví do cytoplasmy hostitelské buňky. Jedním ze způsobů je vpravení virového genomu do cytoplasmy a ponechání kapsidy na povrchu buňky neboli v cytoplasmatické membráně. Jiné způsoby dopravy genomu zahrnuje endocytóza.

Při endocytóze se kapsida nachází uvnitř endosomu [6]. V kyselém pH (5,5) endosomů začne kapsida podléhat strukturním změnám, kdy hydrofobní oblasti kapsidových proteinů interagují s endosomální membránou. Díky této interakci dochází k vytvoření kanálu v kapsidě, ze které je virová RNA vypuštěna. Následně po vypuštění genomu dochází u 5' konce k odštěpení proteinu VPg pomocí „VPg unlinkage activity“. Po více než tři desetiletí zůstala buněčná aktivita tohoto štěpení nepochopena. Nedávno byla tato aktivita identifikována jako TDP2 (z angl. 5'-tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2). V současné době není biologická důležitost odstranění VPg u infekce pikornavirů zcela jasná. Nicméně TDP2 přispívá k efektivní replikaci RNA genomu. Toto štěpení slouží jako inhibice předčasného balení virové částice, protože pouze RNA genomy spojené s VPg na 5' konci podstupují enkapsidaci. Tímto odstraněním pravděpodobně získává virus čas na syntézu proteinů a replikaci genomu.



Obrázek 3. Životní cyklus pikornavirů. Základní schéma ukázky napadení viru hostitelské buňky navázáním na receptor, poté translace, replikace virového genomu a tvorba nových virových částic – infekčních virionů. Převzato a upraveno z [12].

1.1.5 Translace

Translace u eukaryotických buněk probíhá mechanismem závislým na čepičce (z angl. cap dependent). Nicméně genom pikornavirů nemá na 5' konci čepičku, místo toho má interní místo pro vstup ribosomu (IRES), na který nasedá 40S ribosomální podjednotka. Tento mechanismus translace je na čepičce nezávislý (z angl. cap independent) [6]. Genom pikornavirů slouží jako mRNA, jež se od virové RNA liší pouze v nedostatku VPg. Genom tedy podstupuje translaci, čímž vzniká jeden dlouhý polyprotein, který je dále štěpen na menší produkty. První štěpení provádí 2A^{pro} k uvolnění P1 regionu od zbytku polyproteinu. Štěpení zbytku polyproteinu na regiony P2 a P3 zajišťuje 3C^{pro}, která se kromě tohoto štěpení podílí i na dalším štěpení regionů P1, P2 a P3 na prekursorů a jejich štěpením na konečné funkční proteiny [2].

1.1.6 Replikace

Replikace probíhá volně v cytoplasmě a je spojena s buněčnou membránou [2]. Pro syntézu RNA jsou potřeba nejen proteiny hostitelské buňky, ale také virové proteiny (nestrukturální proteiny). Strategie plus ssRNA virů není příliš složitá. Nejdříve dochází k syntéze opačného vlákna, tedy nekódujícího, které slouží jako templát pro výrobu dalších kódujících RNA vláken.

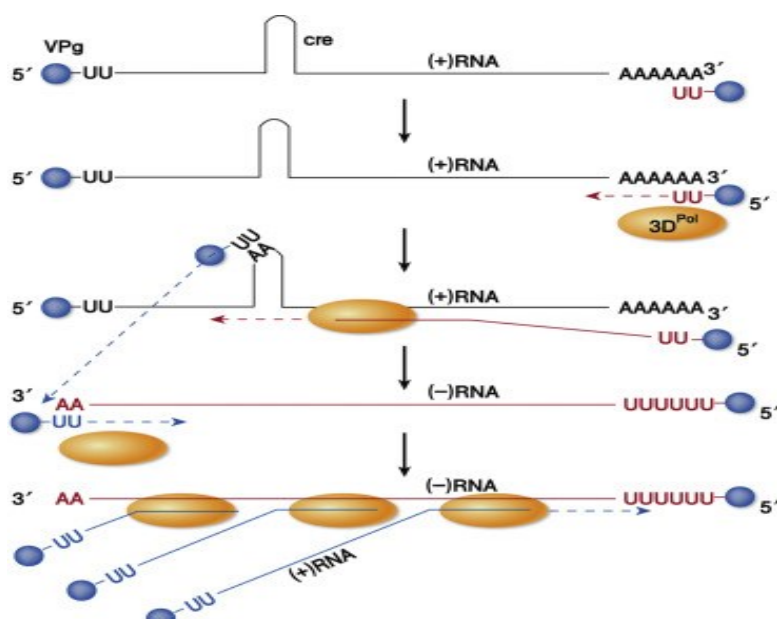
Důležitým iniciačním prvkem je protein VPg (také zvaný 3B) [13]. Genom obsahuje tři důležitá místa pro replikaci, zvaná CRE (z angl. cis-acting replication element). Prvním elementem je struktura „clover-leaf“ lokalizována na 5' UTR, nazývá se oriL. Druhý element představuje oriI neboli struktura steem-loop, jenž se nachází v 2C kódující sekvenci. Třetí element se nachází v 3' UTR, jedná se o strukturu pseudoknot neboli oriR.

1.1.6.1 Syntéza minus ssRNA

Zahájení syntézy nekódujícího vlákna vede tzv. protein-priming. Tímto proteinem, jenž zahajuje syntézu templátu, je VPg. Pomocí RNA-dependentní RNA polymerasy (RdRp, z angl. RNA-dependent RNA polymerase) se VPg připojuje přes hydroxylovou skupinu tyrosinu k jednomu nukleotidu UTP a následně dochází k navázání dalších UTP nukleotidů. Tento proces nazýváme VPg-uridylyce [6]. Uridylovaný VPg interaguje s polyA ocasem na 3' konci genomu a pomocí RdRp dochází k tvorbě nového vlákna. Vzniklé vlákno nemá funkci mRNA, nedochází tedy u něho k translaci, slouží pouze jako kopie pro vznik mnoha dalších kódujících vláken RNA [2].

1.1.6.2 Syntéza plus ssRNA

Při syntéze kódujících vláken hraje nezbytnou roli úsek zvaný CRE neboli oriI, který se nachází na plus vlákně [6]. Podobně jako v předchozím případě dochází ke spojení VPg přes hydroxylovou skupinu tyrosinu s oligonukleotidem, rozdíl ale spočívá v tom, že toto spojení probíhá právě na místě CRE, které leží uprostřed kódujícího vlákna (viz obr. 4, str. 15). Po syntéze primeru VPg-UU dochází k jeho translokaci na 3' konec templátu a pokračuje syntéza kódujícího RNA vlákna. Tento děj se opakuje, přičemž z jednoho templátu vznikne velké množství infekčních (plus) RNA vláken.



Obrázek 4. Schéma replikace genomu. Tato část zahrnuje tvorbu nových kódujících (infekčních) vláken. Vznik primerů pro tvorbu virového genomu zajišťuje CRE element. Převzato z [6].

1.2 Kobuviry

Rodina *Picornaviridae* procházela v posledních letech velkým rozšířením, aktuálně ji tvoří celkem 29 rodů. Jedny z rodů této rozsáhlé rodiny tvoří právě kobuviry [14]. První kobuvirus byl nalezen u lidí a pojmenován Aichi virus, druhý byl nalezen u dobytka a nazván jako bovine kobuvirus, poslední byl izolován z prasat a dostal název porcine kobuvirus [15]. Po navržení taxonomie kobuvirů došlo však k přejmenování těchto virů. Dnes patří mezi kobuviry druhy *Aichivirus A*, *Aichivirus B* a *Aichivirus C*. Každý z nich obsahuje alespoň jednoho zástupce viru [16].

Studie kobuvirů ukázaly, že se jedná o původce gastroenteritidy u lidí a dalších živočišných druhů [17]. Byl prokázán jejich přenos fekálně-orální cestou a také konzumací kontaminovaných potravin a vody. Roku 1989 byl poprvé izolován lidský virus Aichi ve vzorcích stolice pacientů trpící akutní gastroenteritidou v Japonsku. Pacienti se nakazili virem konzumací syrových ústřic. Později byla zjištěna další ohniska, kde se prokázalo spojení s Aichi virem s konzumací ústřic a mořských plodů. Poté došlo ke charakteristice nukleotidové sekvence tohoto viru a následnému rozhodnutí, že by tento virus měl být oddělený od ostatní rodů rodiny *Picornaviridae*. Slovo „kobu“ znamenalo v japonštině boule nebo koule a bylo zvoleno z důvodu morfologické charakteristiky pod elektronovým mikroskopem.

1.2.1 Genom kobuvirů

Kobuviry jsou malé, ikosahedrální viry bez vnějšího obalu [15]. Genom je dlouhý 8280 nukleotidů pro Aichi virus, 8374 nukleotidů pro bovine kobuvirus a 8210 nukleotidů pro porcine kobuvirus. Genom kóduje tedy jeden dlouhý polyprotein, který se štěpí na finální virové proteiny. Všechny kobuviry sdílejí podobné uspořádání. Nestrukturální protein L (z angl. leader protein) se nachází na N konci polyproteinu. Následně jsou v polyproteinu tři strukturační proteiny VP0, VP3, VP1 a sedm nestrukturálních proteinů. Prvních 108 nukleotidů a sekundární struktury domény „stem-loop“ (mají tři typy: SL-A, SL-B, SL-C) jsou velmi podobné a charakteristické pro kobuviry. Tento region hraje zásadní roli v produkci virových částic. Místo IRES pro vstup ribosomu tvoří různé typy a všechny tři druhy kobuvirů obsahují geneticky odlišné IRES sekvence. Rozdíl od ostatních pikornavirů spočívá především ve výskytu L proteinu, dále v absenci VP0 štěpící sítě a odlišné formě 2A proteinu.

L protein patří mezi proteasy, ale jeho funkce není zcela známa [18]. Testy ukázaly, že L protein u Aichi viru nemá autokatalytickou funkci, tudíž není zapojen do štěpení polyproteinu. U spojení L-VP0 dochází ke štěpení za pomoci 3C^{pro}. Při charakterizaci variabilních L mutantů odvozených z infekčních cDNA klonů bylo prozrazeno, že při odstranění aminokyselin v poloze 93 ve střední části, 50 u N konce nebo 90 u C konce dochází buď k úplnému zrušení virové replikace, nebo k nižšímu výtěžku virové replikace. Data ukazují, že L protein zastává důležitou funkci při virové replikaci a také při enkapsidaci virionu.

Jednou z dalších odlišností kobuvirů kromě L proteinu je výskyt proteinu VP0, ten zůstává neštěpen [19]. Ke skládání kapsidy mají tedy k dispozici tři typy podjednotek: VP0, VP1 a VP3. Například u Aichi viru slouží k narušení buňky právě VP0, který obsahuje myristoylový signál a zastává funkci nepřítomného VP4.

1.2.2 Aichi virus 1 (AiV-1)

Aichi virus 1 patří mezi lidské patogeny. Způsobuje infekce spojené s nevolností, gastroenteritidou a horečkou. Celosvětově 80 až 95 % dospělých má protilátky proti tomuto viru [19]. Virus Aichi je považován za příčinu akutní gastroenteritidy, mezi hlavní příznaky patří bolesti břicha, nevolnost, zvracení, horečky a průjem. Jedná se o celosvětové onemocnění, Aichi virus byl již identifikován na všech kontinentech. V nejhorších případech může infekce skončit smrtí u dětí mladších pěti let [15].

1.3 Enteroviry

Rod *Enterovirus* obsahuje malé plus ssRNA viry. Ty se následně rozdělují do 10 druhů pravých enterovirů (*Enterovirus A, B, C, ...*) a tří druhů rinovirů (*Rhinovirus A, B, C*) [20]. Tyto viry infikují vyšší obratlovce a způsobují širokou škálu nemocí. Průběh nemoci může být lehký nebo těžký a způsobit trvalé následky v infikovaném organismu, onemocnění centrální nervové soustavy, paralýzu či dokonce i smrt. Právě enteroviry způsobují závažné smrtelné choroby, jako např. aseptickou meningitidu, enterovirovou encefalitidu a enterovirovou vesikulární stomatitidu. Zbylé tři druhy rinovirů jsou původcem běžného nachlazení. Mezi nejznámější viry z této skupiny řadíme polioviry, jež způsobují poliomyelitidu. Prozatím neexistují žádné účinné látky zaměřené na enterovirová onemocnění.

Podobně jako u ostatních pikornavirů dochází rovnou k translaci genomu enterovirů do jednoho dlouhého polyproteinu, u kterého dochází k štěpení na strukturální proteiny (VP1, VP2, VP3, VP4) a nestrukturální proteiny (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) [21]. Zatímco strukturální proteiny se podílejí na skládání virionů, nestrukturální proteiny hrají důležitou roli při replikaci genomu. Zvláště obě virové proteasy 2A^{pro} a 3C^{pro} zastávají nespočet funkcí během infekce hostitelského organismu a jsou důležité pro syntézu proteinů, replikaci virového genomu a skládání virových částic do virionů.

1.3.1 Coxsackie virus B3 (CVB3)

Jedná se o jeden ze šesti sérotypů virů Coxsackie B skupiny, tedy druhu *Enterovirus B*. Jejich genom má rozsah přibližně 7,4 kb [22]. CVB3 je považován za velmi důležitého infekčního zástupce způsobujícího virové onemocnění srdečního svalu. Může vyvolat buď akutní nebo chronickou formu myokarditidy, což může představovat život ohrožující nemoc s nepříznivým akutním a dlouhodobým výsledkem. [23].

Během virové infekce vstupuje CVB3 do cytoplasmy přes coxsackievirus a adenovirus receptor (CAR, z angl. coxsackievirus and adenovirus receptor) [22]. Následně dochází k translaci RNA vlákna do polyproteinu. První krok zahrnuje štěpení, které zprostředkují proteasy. Mezi jednu z důležitých patří $2A^{pro}$, jež kromě štěpení slouží k zastavení translace hostitelských buněk, apoptose buněk nebo u CVB3 zprostředkuje štěpení dystrophinu, což vyvolá srdeční poškození. Proto $2A^{pro}$ reprezentuje důležitý nestrukturální protein a virový gen pro jeho tvorbu je nezbytný jak pro zranění, tak pro cytopatické procesy. Z tohoto důvodu představuje $2A^{pro}$ ideální cíl pro antivirovou terapii [23].

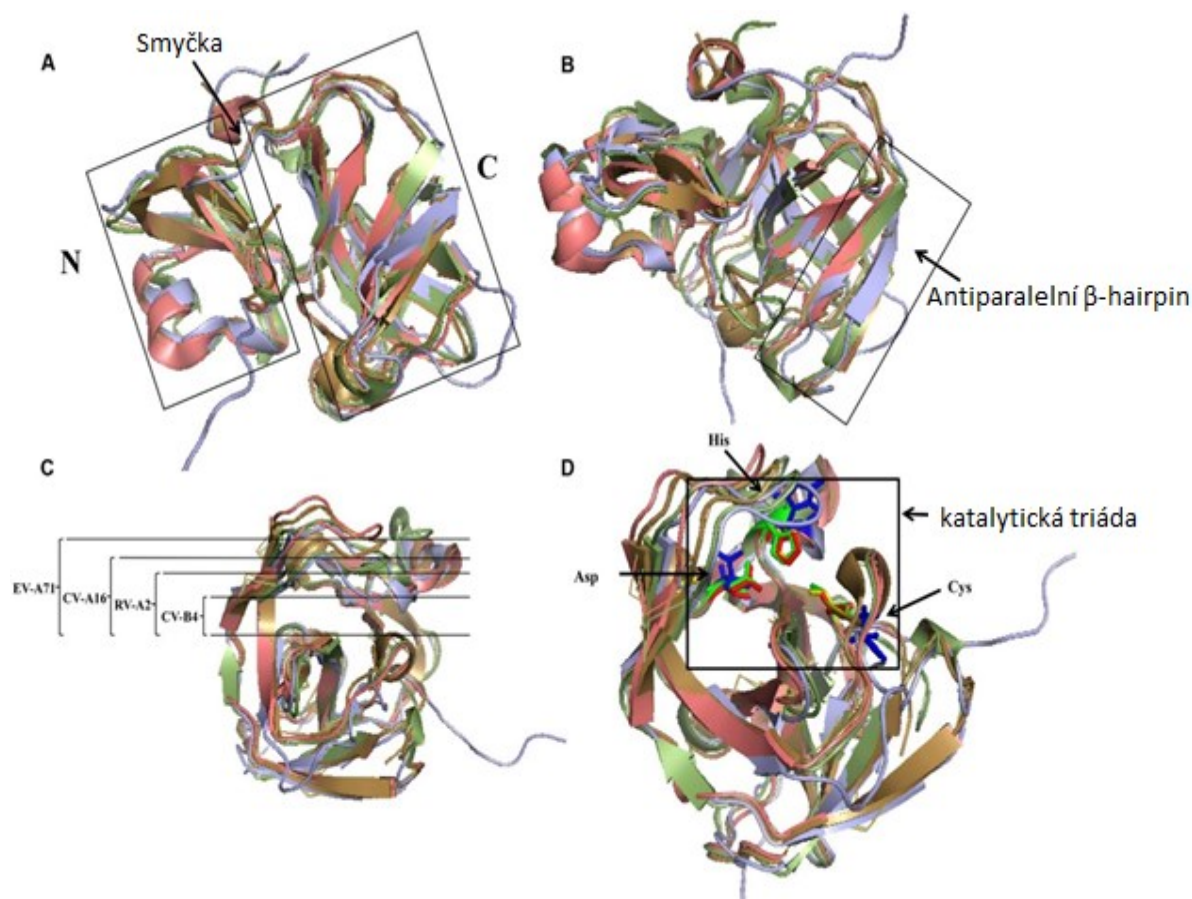
1.4 Protein $2A^{pro}$

Jak jsem již dříve zmínil, jedná se o nestrukturální protein, který hraje důležitou roli při infekci hostitelských buněk [24]. Byly popsány různé odlišnosti v struktuře 2A proteinu. Podle funkce a struktury se následně rozdělují do několika typů. Těchto typů je pět a mezi ně patří $2A^{pro}$ typu chymotrypsin, 2A rodu parechovirů, $2A^{pro}$ viru hepatitidy A, $2A^{pro}$ rodu aphtovirů a poslední $2A^{pro}$ rodu kardiovirů.

CVB3 má $2A^{pro}$ typu chymotrypsin. Tento typ 2A proteinu obsahuje aktivní místo tzv. katalytickou triádu složenou z aminokyselin His-Asp-Cys. Chymotrypsin 2A protein funguje jako proteolytický enzym, kromě toho může pomoci viru obejít imunitní odpověď hostitele [25]. Aichi virus má 2A protein podobný rodu parechovirů. Aktivní místo zde tvoří H-NC box [26].

1.4.1 Struktura chymotrypsin $2A^{pro}$

Většina 2A proteinů z pikornavirů je strukturně příbuzná s chymotrypsin proteasou [24]. Chymotrypsin $2A^{pro}$ obsahuje N doménu (4-vláknový antiparalelní β -sheet) a C doménu (6-vláknový antiparalelní β -barrel). Tyto dvě domény jsou spojeny smyčkou. Uvnitř C domény formulují dvě vlákna antiparalelní β -hairpin (též zvaný dityrosine flap). Důležité místo představuje otevřená štěrbina na povrchu proteinu. Právě v této štěrbině se nachází aminokyselinové zbytky katalytické triády Cys-His-Asp, charakteristické pro chymotrypsin proteasy (viz obr. 5, str. 19). Šířka štěrby může být odlišná u různých enterovirů a její funkce spočívá v interakci s určitým substrátem.



Obrázek 5. Struktura chymotrypsin 2A^{pro}. Vidíme, že struktura proteinu se rozděluje na dvě domény – N a C. Tento typ proteinu 2A^{pro} obsahují hlavně enteroviry. Uprostřed struktury se nachází štěrba s aktivní místem tvořící katalytickou triádu Cys-His-Asp. Převzato a upraveno z [24].

1.4.2 Funkce chymotrypsin 2A^{pro}

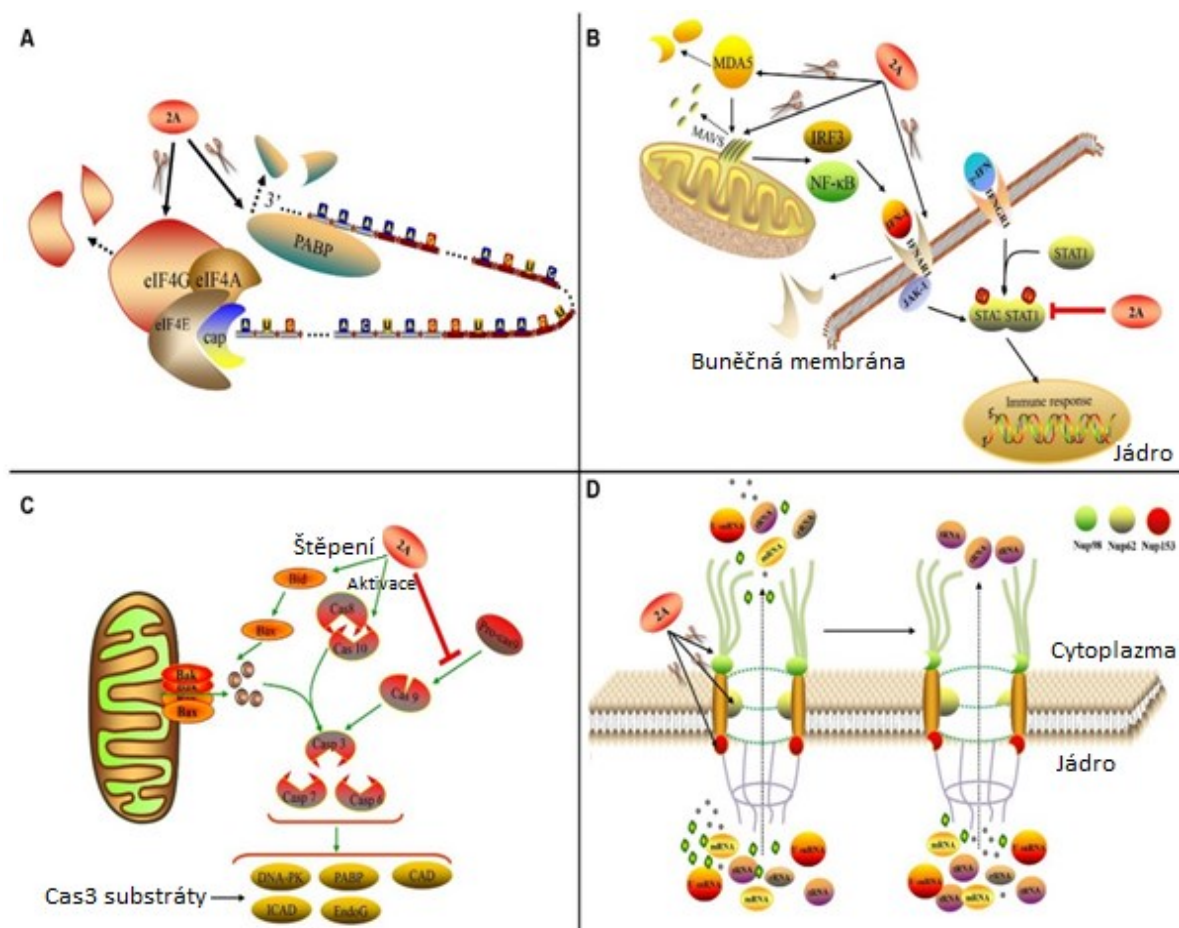
Kromě štěpení v úseku VP1/2A také plní 2A^{pro} funkci při inaktivaci translačního mechanismu hostitele [27]. U eukaryotických buněk vstupuje ribosom na vlákna mRNA přes strukturu čepičky. Translačním iniciačním faktorem eukaryotických buněk, který rozpoznává čepičku, je eIF4E, jenž interaguje s eIF3. Ribosomální podjednotka 40S je spojena s eIF3, čímž začíná translace. V infikovaných buňkách dochází ke štěpení N terminální domény eIF4G pomocí 2A^{pro} (viz obr. 6A, str. 21). Zbytek proteinu eIF3 spojený s ribosomální podjednotkou interaguje s místem na virovém genomu zvaným IRES, tím místo translace buněčných proteinů dochází k translaci virových proteinů, jelikož doména eIF4G je postradatelná pro vazbu k místu IRES. Virus tak inhibuje syntézu hostitelských proteinů, jež mohou plnit funkci antivirových proteinů [6].

Dokonce 2A^{pro} blokuje transport makromolekul mezi cytoplasmou a jádrem tak, aby došlo k izolaci jaderných procesů od cytoplasmatických buněčných procesů. Tím zabraňuje transportu specifických protizánětlivých transkripčních faktorů do jádra nebo naopak vstupu mRNA kódující protizánětlivé, antivirové proteiny do cytoplasmy [28]. Transport těchto molekul probíhá přes NPC zakotvených v jaderné membráně, jež se skládají z vícenásobných Nups. Schopnost 2A^{pro} ovlivnit transport makromolekul spočívá ve štěpení Nups (viz obr. 6D, str. 21). [24].

CVB3 způsobuje virovou myokarditidu, ale stále chybí účinné vakcíny a antivirové terapie [29]. Proto je potřeba pochopit interakce mezi virem a hostitelem. Bylo prokázáno, že během virové infekce CVB3 využívá 2A protein k nadměrné akumulaci lipidů v hostiteli, což přispívá k replikaci viru. Hlavním regulátorem buněčného metabolismu lipidů je SREBP1, který aktivuje na transkripční úrovni 2A protein prostřednictvím mechanismu zahrnující signalizační cestu MEK/ERK a transkripční faktor SP1, tím dochází k akumulaci buněčných lipidů.

Další funkce 2A proteinu u infekce CVB3 zahrnuje aktivaci buněčné smrti, tedy apoptosu [22]. Na aktivaci apoptosu se podílí jak 2A^{pro}, tak i 3C^{pro}. Jedna cesta vede přes aktivaci kaspasy-8 a druhá přes štěpení Bid za vzniku zkrácené formy (tBid), jež vstupuje do mitochondrie a vede k vypuštění cytochromu c a k aktivaci kaspasy-9 a kaspasy-3 (viz obr. 6C, str. 21). Celkově data naznačují, že 2A^{pro} vyvolává apoptosu jak aktivací proapoptotických mediátorů, tak potlačením transkripce a translace.

Mezi další zásadní role 2A^{pro} patří inhibice vnitrobuněčné imunitní odpovědi hostitele [24]. Dochází k útoku na dráhy k výrobě interferonů (IFN). Např. dráha MDA5/MAVS zodpovídá za rozpoznání infekce hostitelskou buňkou. Pomocí této dráhy dojde k vyvolání exprese IFN-I. Některé enteroviry dokážou použít 2A^{pro} na štěpení klíčových proteinů dráhy pro expresi IFN-I. Mohou i jinou cestou zablokovat produkci IFN, a to pomocí štěpení IFN receptoru – IFNAR1. Tím zablokuje janus kinasu (Jak) a následnou signalizaci transkripce přes STAT k tvorbě IFN (viz obr. 6B, str. 21).



Obrázek 6. Funkce 2A chymotrypsin proteasy. A) 2A^{pro} při štěpení hostitelských translačních faktorů. B) Role 2A^{pro} proti imunitní odpovědi hostitele. C) Schopnost 2A^{pro} vyvolat apoptosu. D) Funkce 2A^{pro} při transportu makromolekul mezi cytoplasmou a jádrem. Převzato a upraveno z [24].

1.4.3 Funkce 2A rodu parechovirů

Typ 2A proteinu parechovirů má konzervovaný H-NC box a vyskytuje se u Aichi viru [24]. Nejedná se o proteasu, což je u pikornavirových 2A proteinů neobvyklé. Tento typ 2A proteinu má příbuznost k lidskému H-rev107 proteinu. Členové této rodiny se zapojují do šíření proliferace buněk. Protein 2A dokáže interagovat se všemi nestrukturálními proteiny kromě L a 3AB. Pomocí interakce dokáže efektivně štěpit polyprotein, např. u Aichi viru je pro štěpení mezi úsekem VP1/2A vyžadována interakce 2A proteinu s 3CD.

Ukázalo se, že hlavní role 2A proteinu Aichi viru spočívá v procesu replikace viru [30]. U 2A proteinu parechovirů bylo dokázáno, že interaguje s 3' UTR genomu. Tato část genomu se zapojuje do syntézy pozitivního i negativního vlákna. Pravděpodobně pomocí této interakce v oblasti 3' UTR genomu je 2A protein schopný se zapojit do virové replikace.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo izolovat a exprimovat 2A proteiny. Jedná se o proteiny, které hrají důležitou roli při replikaci virového genomu. Rozhodli jsme se studovat 2A proteiny ze dvou lidských pikornavirů – Aichi viru (AiV-1) a Coxsackie viru B3 (CVB3). Postup práce zahrnoval přípravu expresních plasmidů, dále expresi 2A proteinů a finálně izolaci a purifikaci rekombinantních 2A proteinů.

3 Materiály a metody

3.1 Materiály

3.1.1 Přístroje

Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforesu	Consort EV 231 (P-LAB, Česká republika)
Centrifugy	Avanti Centrifuge J-265 XPI, rotor JLA-9.1000 (Beckman Coulter, USA) Avanti Centrifuge J-30I, rotor JLA-16.250 (Beckman Coulter, USA) Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1 (Eppendorf, Německo) Allegra X-15R, rotor SX4750A (Beckman Coulter, USA)
Homogenizátor podle Dounceho	Pyrex
Kolony pro gelovou chromatografii	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg (GE Healthcare, USA) HiPrep™ 26/10 Desalting (GE Healthcare, USA) HisTrap™ Fast Flow, 5ml (GE Healthcare, USA)
Koncentrátor	Vivaspin Turbo 4, 10000 MWCO (Sartorius AG, Německo)
Magnetická míchačka	ARE (VELP, Itálie)
Malá třepačka	Incubating Mini Shaker (VWR, Česká republika)
Mikrospektrofotometr	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Scientific Industries, USA)
PCR cyklér	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line (Německo)
Rotační inkubátor	Innova 44, Inkubator Shaker Series, New Brunswick Scientific (Eppendorf, Německo)
Sběrač frakcí	Fraction Collector F9-C (Cytiva, USA)
Sonifikátor	Sonopuls (Bandelin, Německo)

Spektrofotometr	BioPhotometer plus (Eppendorf, Německo)
Termostat	IPP 400 (Mettler, Německo)
UV fotoaparát	Quantum ST4-1100 (Vilber Lourmat, Francie)
Vertikální elektroforesa	Mini-PROTEIN Tetra System, (Bio-Rad, USA)
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus (Grant Instruments, Velká Británie)
Vortex	Vortex Gene 2 (Scientific Industries, USA)
Zdroj pro vertikální elektroforesu	PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
Rotátor	TubeRoller R3005 (Benchmark Scientific, USA)
AKTA	AKTA TM Pure (Cytiva, USA)

3.1.2 Chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektroforesu, SERVA (Německo)
β-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich (USA)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich (USA)
Dialysační střevo	Dialysing tubing visking, cellulosa, typ 27/32 šířka 34 mm, průměr 21,5 mm, MWCO 14000
Ethidium bromid	Carl Roth (Německo)
Kanamycin	Carl Roth (Německo)
Ni-NTA agarosa	Protino
SDS	Carl Roth (Německo)
Standard pro DNA elektroforesu	Gene Ruler TM 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific (USA)
Standard pro proteinovou elektroforesu	PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Scientific (USA)
TEMED	Carl Roth (Německo)
Tris-Cl	Carl Roth (Německo)

3.1.3 Roztoky, pufry a média

CBB barvicí roztok	3mM Coomassie Brilliant Blue, 1,5M CH ₃ COOH, 50% (v/v) methanol
Dialysační pufr	50mM Tris (pH 8,0), 300mM NaCl, 1mM β-merkapt ethanol, 20mM imidazol
Ekvilibrační pufr pro afinitní chromatografie	50mM EDTA, 500mM NaCl, pH 8,0
Eluční pufr pro afinitní chromatografie	300mM imidazol, 50mM Tris (pH 8,0), 300mM NaCl, 10% glycerol, 3mM β-merkapt ethanol
Lysační pufr	20mM imidazol, 50mM Tris (pH 8,0), 300mM NaCl, 10% glycerol, 3mM β-merkapt ethanol
Ligační pufr	5x Rapid Ligation pufr, Thermo Scientific (USA)
LB agar podle Lennox	P-lab (Česká republika)
LB medium podle Lennox	P-lab (Česká republika)
Vzorkový pufr pro DNA elektroforesu	6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific (USA)
Vzorkový pufr pro SDS elektroforesu	4x Roti Load®1, Carl Roth (Německo)
Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25mM Tris NaCl, 0,25M glycin, 0,1% (w/w) SDS, pH 8,8
Sady pro purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification kit, Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
TAE pufr	40mM Tris, 20mM CH ₃ COOH, 1mM EDTA, pH 8,0
Restrikční pufr	10x Fast Digest Green pufr, Thermo Scientific

ZY médium	1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 2,8mM glukosa; 6mM laktosa; 0,5% (v/v) glycerol; 1mM MgCl ₂ ; 25mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 50mM KH ₂ PO ₄ ; 50mM Na ₂ HPO ₄
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.1.4 Složení gelu na DNA

Agarosový gel	1% (w/v) agarosa 0,01% (v/v) ethidium bromid Rozpuštěný v TAE pufru
---------------	---------------------------------------------------------------------------

3.1.5 Složení gelů na SDS-PAGE

Zaostřovací gel	125mM Tris-Cl (pH 6,8) 4% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1% (w/v) SDS 0,005% (v/v) TEMED 0,05% (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
SeparáčnÍ gel	375mM Tris-Cl (pH 8,8) 15% (w/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1% (w/v) SDS 0,001% (v/v) TEMED 0,05% (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈

3.1.6 Enzymy

Endonukleasa <i>Bam</i> HI	Thermo Scientific (USA)
Endonukleasa <i>Not</i> I	Thermo Scientific (USA)
Endonukleasa <i>Nco</i> I	Thermo Scientific (USA)
Polymerasa 2x PCRBIO Taq Mix Red	PCR Biosystems (Velká Británie)
Ulp1 proteasa	Připraveno v laboratoři
TEV proteasa	Připraveno v laboratoři

3.1.7 Primery

Forwardní primer AiV	5' CAGAC CC ATG GGG GGC GCC GCC TCA GCG ACT 3'
Reversní primer AiV	5' GTCTG GCGGCCGC TTA CTG TCG CCT GAT GCC TGG 3'
Forwardní primer CVB3	5' CAGAC GGA TCC GGA CAA CAA TCA GGG GCA G 3'
Reversní primer CVB3	5' GTCTG GCGGCCGC TTA CTG TTC CAT TGC ATC ATC TTC 3'
Reversní primer pSumo	5' CTT AAG ATT CTT GTA CGA CGG T 3'
Reversní primer pHGB1	5' CAG TAC GCT AAC GAC AAC GGT G 3'
Reversní primer T7 (Sto720)	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'

3.1.8 Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> BL21 Star	Life Technologies (USA)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Invitrogen (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Templátová DNA byla již dostupná v laboratoři. Templát byl ředěný poměrem 1 : 1000. Následně byla připravena reakční směs pro PCR reakci podle tab. 1. Celkově byl stanoven objem reakční směsi na 20 μ l. Pro návrh podmínek PCR reakce byly využity hodnoty teplot tání obou primerů příslušného viru (viz tab. 2 a tab. 3, str. 29).

Tab. 1: Složení reakční směsi pro PCR.

Složky	Množství
Templát (1 : 1000)	8 μ l
Forwardní primer	1 μ l
Reversní primer	1 μ l
Polymerasa 2x PCRBIO Taq Mix Red	10 μ l

Primery dodala firma Sigma-Aldrich (USA). Nukleotidové sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole 3.1.7, str. 27.

Tab. 2: Podmínky PCR pro AiV.

Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]
1	98	30
30	98	5
	68	5
	72	8
1	72	300

Tab. 3: Podmínky PCR pro CVB3.

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	98	30
30	98	5
	58	5
	72	8
1	72	300

3.2.2 Horizontální agarosová elektroforesa

Byl použit gel složený z 1% agarosy a s 0,01% ethidium bromidem. Do první jamky byly naneseny 2 µl standardu Gene ruler. Do dalších jamek byly naneseny 2 µl vzorku amplifikovaného DNA úseku pro 2A proteiny, které byly smíchány s 1 µl nanášecího pufru (DNA Loading Dye). Elektroforesa běžela v horizontálním uspořádání 12 minut při napětí 300 V. Pro zviditelnění DNA byl použit UV fotoaparát QUANTUM ST4-1100.

3.2.3 Purifikace

Pro purifikaci PCR produktů byla použita silikagelová mikrokolona. Na tuto mikrokolonu bylo zachyceno DNA, kde došlo k jeho promytí za použití PE pufru. Tím byla DNA zbavena nečistot a následně byla eluována pufrem EB. Při purifikaci bylo postupováno dle pokynů výrobců QIAquick PCR Purification Kit [31].

3.2.4 Štěpení produktů PCR a plasmidů

K produktům PCR bylo přidáno po 2 µl restrikčních endonukleas. Pro AiV byly přidány enzymy *NcoI* a *NotI*. Pro CVB3 byly přidány enzymy *BamHI* a *NotI*. Dále bylo přidáno 4,4 µl pufru Fast Digest Green. Tímto byly vzorky připraveny na štěpení a umístěny na třepačku po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Následně byly obdrženy již štěpené plasmidy. Pro AiV to byl pHGB1 plasmid a pro CVB3 se jednalo o plasmid pSumo.

3.2.5 Ligační směs

Byla připravena směs, ve které dochází k vložení DNA (insert) do plasmidu (vektor). DNA i plasmidy se štěpily specifickými restrikčními endonukleasami. Na vložení DNA do plasmidů byla připravena ligační směs podle tab. 4. Ligace byla ponechána po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.

Tab. 4: Příprava ligační směsi.

Složky	V [μl]
Štěpený produkt PCR	5,5
Plasmid	0,7
Ligační pufr	1,5
T4 DNA ligasa	0,3
H ₂ O	7
Celkový objem	15

3.2.6 Transformace bakteriemi *E. Coli* DH5α

Na ledu (cca 4 °C) byly drženy vzorky s ligační směsí. Následně se do ligační směsi vložilo 100 μl kompetentních bakterií *E. Coli* kmene DH5α. Tyto směsi byly drženy na ledu přibližně 15 minut. Po této době byly buňky transformovány metodou tepelného šoku, tedy teplotou 42 °C po dobu 45 sekund. Poté byly vzorky drženy na ledě 3 minuty. Do suspenze bakterií bylo přidáno 1 ml LB média a buňky byly kultivovány na třepačce po dobu 30 minut a při teplotě 37 °C. Za aseptických podmínek byla suspenze bakterií rozetřena na Petriho miskách s LB agarem. Petriho misky byly inkubovány přes noc v převrácené poloze při teplotě 37 °C. Další den byly zaznamenány kolonie bakterií.

3.2.7 PCR z kolonií a minipreparace DNA

Pomocí špičky pipety byla odebrána část biomasy kolonií narostlých přes nos a vložena do směsi pro PCR. Příprava směsi byla provedena podle tab. 5. Dohromady bylo připraveno 12 mikrokumavek, kde šest bylo tvořeno sekvencí z AiV a zbylých šest sekvencí z CVB3. Reversní primer byl odlišný od prvního provedení PCR (viz kapitola 3.2.1, str. 28), a tudíž i teplota pro PCR byla změněna (viz tab. 6, str. 32). Produkty reakcí byly následně odděleny v horizontální agarosové elektroforese za přítomnosti ethidia bromidu a vizualizovány UV fotoaparátem. Po vizualizaci byly přeneseny nejlepší tři vzorky kolonií do 5 ml tekutého média. Suspenze bakterií byla kultivována na třepačce přes noc při teplotě 37 °C a otáčkách 220 RPM. Následně byla plasmidová DNA izolována pomocí soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit [32].

Tab. 5: Příprava směsi pro PCR z kolonií agarových ploten.

Složky	V [μl]
Biomasa z 1 kolonie	-
Polymerasa 2x PCRBIO Taq Mix Red	10
Forwardní primer	1
Reversní primer	1
H ₂ O	8
Celkový objem	20

Tab. 6: Reversní primery pro směs do PCR a podmínky pro PCR (časy PCR reakce se nezměnily, proto zde nejsou uvedeny, viz tab. 2, str. 28).

Název viru	Reversní primer	Počet cyklů	Teplota / °C
AiV	pHGB1	1	98
		30	98
			62
			72
			72
CVB3	pSumo	1	98
		30	98
			52
			72
		1	72

Byla změřena koncentrace plasmidové DNA při $\lambda = 260 \text{ nm}$.

3.2.8 Sekvence plasmidové DNA

Do šesti mikrozkušavek se připravily reakční směsi pro sekvanaci. Bylo postupováno podle tab. 7. Takto připravené reakční směsi byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou Eurofins Genomics.

Tab. 7: Složení směsi pro sekvenování.

Složky	V [μl]
Plasmid	1,5
Primer Sto720	2,5
H ₂ O	6

3.2.9 Exprese rekombinantních proteinů v *E. Coli* BL21 Star

Po sekvenování byly vybrány dva plasmidy, u kterých nebyla nalezena žádná mutace. Nasledně bylo odebráno po 1 μl těchto plasmidů a vloženo do 30 μl bakterií BL21 Star. Vpravení expresních vektorů do bakterií BL21 Star proběhlo metodou tepelného šoku popsané v kapitole 3.2.6, str. 30. Výsledné roztoky bakterií byly přeneseny do 1 ml LB média a inkubovány 20 minut na třepačce bez přídavku antibiotik. Takto vytvořená inokula byla přenesena do 100 ml LB média obsahující kanamycin a inkubována přes noc na třepačce při teplotě 37 °C a otáčkách 220 RPM.

Další den bylo odebráno po 8 ml bakteriální kultury a zaočkováno do 10 x 1 L sterilního autoindukčního ZY média obsahující 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ kanamycinu. Médium ZY s bakteriemi bylo inkubováno v třepačce po dobu 4 hodin o teplotě 37 °C při otáčkách 220 RPM. Když optická denzita bakteriální kultury dosáhla přibližně jedné, byla teplota snížena na 18 °C a bakterie byly inkubovány při této teplotě přes noc.

3.2.10 Centrifugace a lyse buněk

Bakteriální kultura připravená v předchozí kapitole byla odstředěna na centrifuze Avanti Centrifuge J-265 XPI po dobu 6 minut při 6000 RPM, 4 °C a rotoru JLA-9.1000. Supernatant byl odstraněn a peleta byla následně resuspendována v přibližně 80 ml lysačního pufru pomocí vortexu. Poté byla suspenze homogenizována na ledu pomocí homogenizátoru podle Dounceho.

Lyse buněk byla provedena sonikátorem Bandelin sonoplus (5 cyklů po 1 minutě). Při sonifikaci byly vzorky drženy na ledu. Vzniklý lysát byl odstředěn na centrifuze Avanti Centrifuge J-30I (20 min při 20 000 RPM, rotor JLA-16.250).

3.2.11 Afinitní (chelatační) chromatografie

Při afinitní chromatografii je cílový protein opatřen afinitní značkou (z angl. affinity tag) [33]. Exprimovaný protein v našem případě obsahoval značku v podobě šesti za sebou vázaných histidinů. Tato histidinová kotva se váže koordinačně-kovalentní vazbou na nikelnaté ionty kolony. Vazbu zprostředkovávají volné elektronové páry dusíku ve struktuře imidazolu histidinových zbytků.

Supernatant z předchozí kapitoly byl oddělen od pelety a byl uschován pro zachycení 2A proteinů. Pro zachycení proteinů byla použita plastová kolona s Ni-NTA agarosou. Kolona byla nejdříve promyta ekvilibračním pufrem, následně vodou a naposledy 0,5M hydroxidem sodným. V tomto okamžiku došlo k navázání nikelnatých iontů na chelatující agarosu. Výsledná Ni-NTA agarosa byla pomocí špachtle přenesena do zkumavek s proteiny (uschovaný supernatant) a ponechána inkubovat po dobu 30 minut při teplotě 4 °C za stálého otáčení na přístroji TubeRoller.

Suspenze byla odstředěna na centrifuze Allegra X-15R, rotor SX4750A při teplota 4 °C a otáčkách 1620 RPM po dobu 3 minut. Supernatant byl vylit do odpadu a peleta byla znovu odstředěna v lysačním pufru za stejných podmínek. Tento postup byl opakován třikrát, jednalo se o vsádkovou metodu afinitní chromatografie za účelem zbavení nečistot. Čirý supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 10ml lysačním pufru a přenesena na plastovou kolonu o celkovém objemu 15 ml. Z plastové kolony se navázané proteiny eluovaly do zkumavek použitím elučního pufru. Přítomnost proteinů byla analyzována pomocí SDS elektroforesy, viz výsledky.

3.2.12 Dialyza

Izolované rekombinantní proteiny byly přeneseny do dialyzačního střeva (MWCO 14000) a byly dialysovány proti jednomu litru dialyzačního pufru přes noc za stálého míchání na magnetické míchačce (teplota 4 °C).

3.2.13 Štěpení TEV proteasou a Ulp1 proteasou

Do vzorku obsahující 2A protein AiV byl vložen celý alikvot TEV proteasy. Naproti tomu vzorek s 2A^{pro} CVB3 byl štěpen 10 µl Ulp1 proteasy. Po vložení enzymů se vzorky ponechaly v lednici štěpit přes noc. Kromě toho byl odebrán 1 ml z obou vzorků před štěpením a uschován v lednici. Další den bylo zjištěno pomocí SDS elektroforesy, zda byly proteiny v celém objemu štěpeny a zbaveny histidinové kotvy, viz výsledky. U vzorku s 2A proteinem AiV byly zaznamenány proteiny, u kterých ke štěpení histidinové kotvy nedošlo, a proto byl přidán druhý alikvot TEV^{pro} a 10 µl β-merkaptoethanolu.

3.2.14 Koncentrování proteinu

Pro koncentrování 2A proteinů byl použit Vivaspın Turbo 4 (10,000 MWCO). Po přenesení do koncentrátoru byly 2A proteiny několikrát odstředěny na centrifuze Allegra X-15R při 4 000 RPM, dokud objem nedosáhl přibližně 4 ml.

3.2.15 Gelová permeační chromatografie

Protein byl oddělen na základě velikosti gelovou permeační chromatografií. Jedná se o metodu, kde kolona vybavena určitou stacionární fází zadržuje proteiny o malé velikosti, ty protékají jako poslední, ale větší proteiny vytékají jako první. Pro separaci proteinů byl využit systém AKTATM Pure a sběrač frakcí Fraction Collector F9-C. Analýza frakcí byla poskytnuta spektrofotometricky při 254 nm a 280 nm. Pro ověření přítomnosti proteinů ve frakcích byla provedena SDS elektroforesa, viz výsledky.

První vzorek rekombinantního 2A proteinu AiV byl přenesen pomocí dialysačního střeva do dialysačního pufru, tudíž byla použita kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Jako první byla kolona promyta vodou a následně ekvilibrována puftrem A. Na kolonu byl vzorek 2A proteinu nanesen přes smyčku dlouho 5 ml.

Pro druhý vzorek rekombinantního 2A proteinu CVB3 nebylo použito dialysační střevo a byly použity dvě kolony – HisTrap FF (5 ml) a HiPrep 26/10 Desalting. Pro tento vzorek byla zvolena rychlejší cesta přes odsolovací kolonu, kdy došlo k výměně pufrů. Pomocí kolony HisTrap byla zachycena histidinová kotva. Protein byl eluován jako první v lysačním pufru, kterým byla kolona před startem ekvilibrována. Vzorek 2A proteinu byl nanesen přes smyčku dlouhou 5 ml.

Tab. 8: Použité pufrы pro gelovou permeační chromatografii.

Lysační pufr	20mM imidazol, 50mM Tris (pH 8,0), 300mM NaCl, 10% glycerol, 3mM β-merkaptoethanol
Pufr A	20mM Tris (pH 7,4), 200mM NaCl, 3mM β-merkaptoethanol

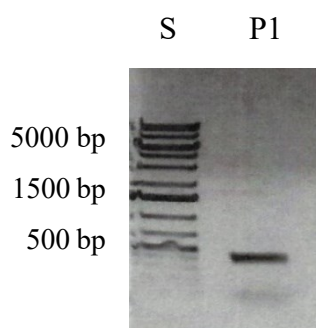
3.2.16 Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS (SDS-PAGE)

Z grafu gelové permeační chromatografie byly vybrány tři frakce s největší absorbancí při 280 nm. Tyto frakce byly smíchány s 5 µl 4x koncentrovaného redukujícího nanašecího pufru na celkový objem 10 µl. Takto připravené frakce a 5 µl standardu (Page ruler) byly nanesený na polyakrylamidový gel připravený z 15% separačního a 4% zaostřovacího gelu podle kapitoly 3.1.5, str. 26. Elektroforesa probíhala 45 minut při napětí 220 V. Jako elektroforetický pufr byl použit Tris-glycinový pufr obsahující 0,1% SDS. Separované frakce rekombinantních 2A proteinů byly barveny v Coomassie Brilliant Blue a následně odbarveny v destilované vodě.

4 Výsledky

4.1 Příprava expresního plasmidu, exprese a purifikace rekombinantního proteinu 2A AiV

Pro amplifikaci nukleotidové sekvence 2A proteinu pomocí PCR došlo k použití forwardního primeru a reversního primeru příslušného viru. Forwardní primer obsahoval *NcoI* štěpící sekvenci a reversní primer *NotI* štěpící sekvenci. Podle teploty tání primerů byla stanovena teplota pro PCR reakci. Došlo k vizualizaci vzorku z PCR na horizontální agarosové elektroforese, viz obr. 7. Elektroforetická pohyblivost produktu PCR reakce odpovídala sekvenci 2A proteinu (408 bp).

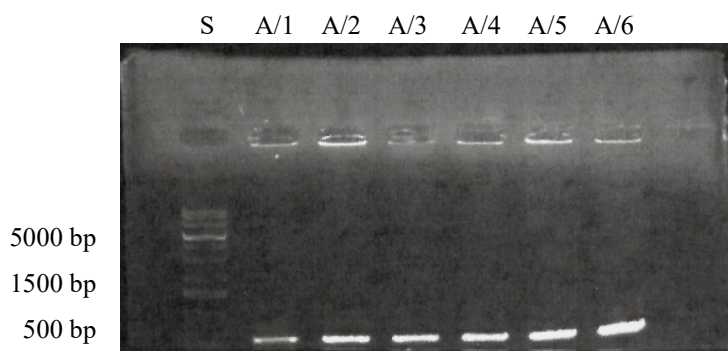


Obrázek 7. Horizontální agarosová elektroforeza pro PCR produkt. Směs do PCR byla složena z DNA templátu (1 : 1000), forwardního primeru, reversního primeru a polymerasy MM. S – standard, P1 – PCR produkt pro AiV.

Sekvence genu pro 2A protein byla zaklonována do plasmidu pHGB1 pomocí restričního klonování. Připravený plasmid byl transformován do kompetentních bakterií DH5 α podle postupu popsaného v kapitole 3.2.6, str. 30. Ze získaných bakteriálních kolonií bylo vybráno šest vzorků pro druhou PCR reakci z kolonií. Jako reversní primer byl použit pHGB1 a forwardní primer zůstal stejný jako při první PCR reakci. Můžeme vidět, že u každého vzorku došlo k amplifikaci vloženého insertu (viz obr. 8, str. 37). Dále byla odebrána část biomasy z narostlých kolonií a inokulována do LB média. Poté byla DNA těchto narostlých bakterií přečištěna a izolována pomocí soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit [32]. Nakonec byla změřena absorbance plasmidové DNA (viz tab. 9, str. 37).

Tab. 9: Hodnoty absorbance plasmidové DNA při 260 nm.

Vzorky	Absorbance [ng/μL]
A/4	168,4
A/5	160,8
A/6	160,7



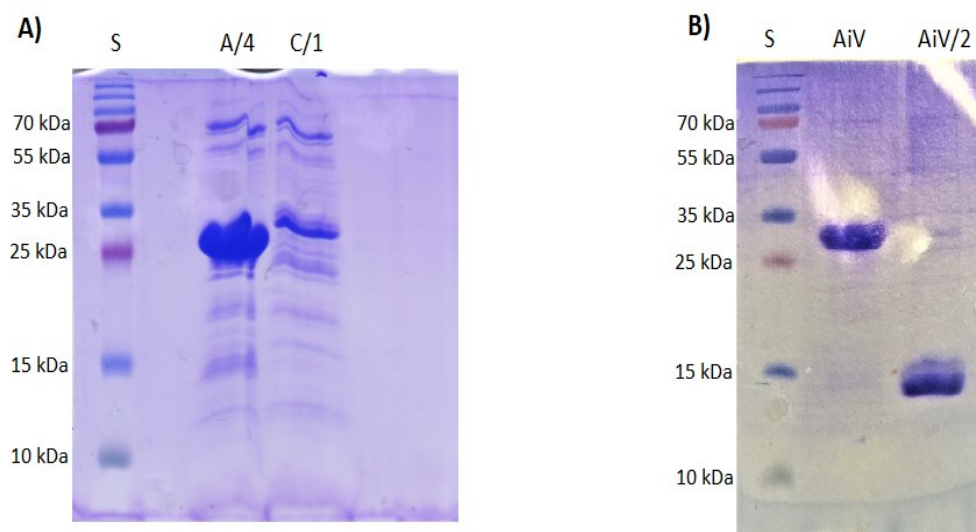
Obrázek 8. Elektroforesa na agarosovém gelu pro produkty PCR z kolonií.

Z narostlých kolonií bylo odebráno šest vzorků a smícháno s primery a Taq polymerasou. Pro další práci s plasmidovou DNA byly kultivovány bakterie vzorku A/4, A/5 a A/6.

Zda DNA obsahuje správnou nukleotidovou sekvenci pro 2A protein bylo zjištěno sekvenováním Sangerovou metodou. Pouze jeden vzorek se sekvencí 2A proteinu AiV byl v pořádku (bez zásadní chyby v nukleotidové sekvenci) a byl dále transformován do kompetentních bakterií *E. Coli* kmene BL21 Star.

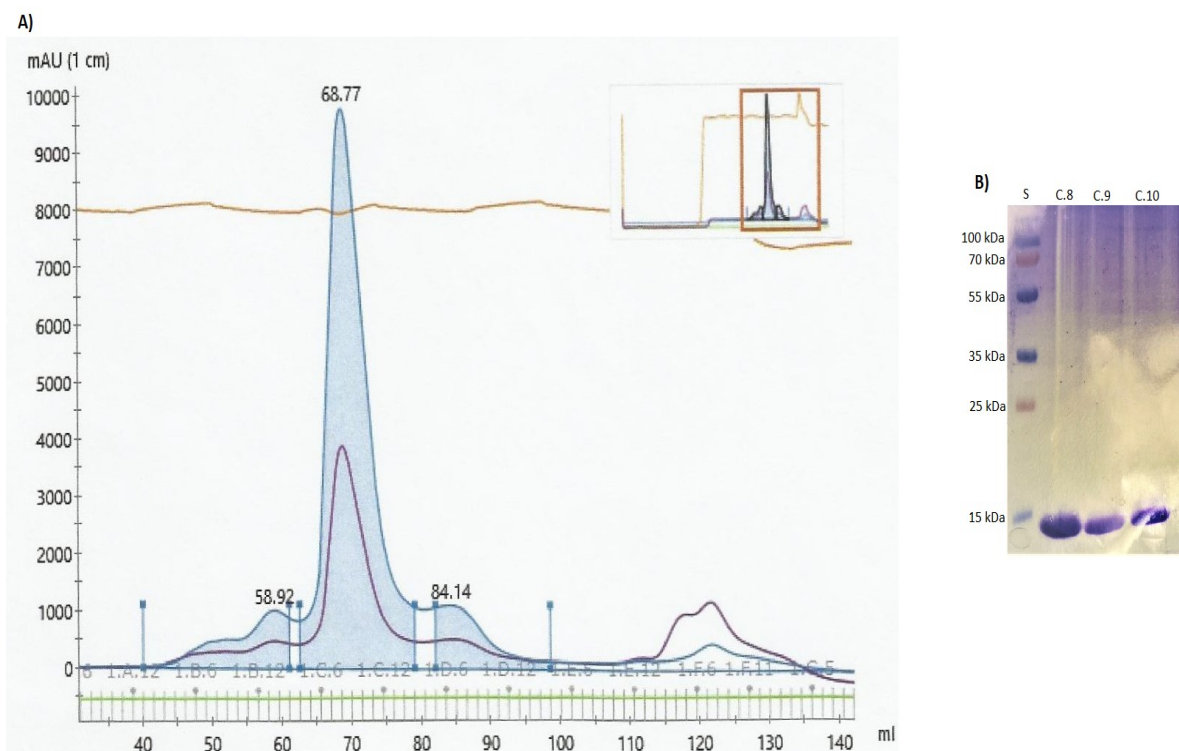
Protein 2A byl exprimován v autoindukčním médiu ZY. Dále byl 2A protein Aichi viru purifikován. Peleta s bakteriální kulturou byla homogenizována, poté sonifikována UV sondou a odstředěna. Protein obsahující His kotvu byl izolován pomocí afinitní chelatační chromatografie na nikelnatých iontech imobilizovaných na NTA-agarose. Z plastové kolony byl 2A protein zachycen do zkumavky za použití elučního pufru, jenž obsahoval zvýšenou koncentraci imidazolu (300 mM). Byla provedena SDS elektroforesa pro kontrolu izolace proteinu 2A (viz obr. 9A, str. 38). Na obrázku vidíme, že 2A protein Aichi viru se nachází kolem velikosti 25 kDa, což odpovídá vypočtené hodnotě proteinu 2A s His kotvou pro AiV (24,2 kDa).

V tomto okamžiku byla použita TEV proteasa, díky které byla odstraněna histidinová kotva za vzniku rekombinantního proteinu 2A. Byla provedena elektroforesa pro vzorek s 2A proteinem před štěpením a po štěpení TEV proteasou. Na obr. 9B, str. 38, můžeme vidět, že vzorek s 2A proteinem Aichi viru byl úspěšně štěpen od histidinové kotvy.



Obrázek 9. SDS-PAGE analýza izolace a štěpení 2A proteinu. A) Tento gel byla kontrola izolace 2A proteinů po afinitní chelatační chromatografii. S – standard, A/4 – vzorek 2A proteinu AiV, C/1 – vzorek proteinu 2A^{pro} CVB3. B) Porovnání vzorku s 2A proteinem obsahující stále His kotvu a stejného vzorku, kam byly vloženy dva alikvoty TEVpro. S – standard, AiV – vzorek 2A proteinu před štěpením, AiV/2 – vzorek 2A proteinu po štěpení.

Rekombinantní protein 2A byl purifikován gelovou permeační chromatografií podle postupu popsaného v kapitole 3.2.15, str. 35. Průběh gelové permeační chromatografie je znázorněn na obr. 10A, str. 39. V grafu můžeme vidět, že v největším píku se nachází hledaný 2A protein AiV. Naposledy byla provedena SDS elektroforesa pro tři vybrané frakce, které se nachází uprostřed největšího píku při absorbanci 280 nm. Na elektroforetickém gelu všechny tři proužky odpovídají velikost 2A proteinu AiV, tedy 14,4 kDa (viz obr. 10B, str. 39).

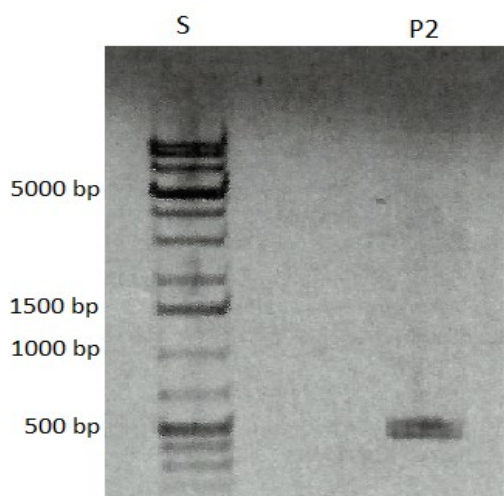


Obrázek 10. Graf gelové permeační chromatografie a SDS-PAGE pro tři frakce.

A) Průběh gelové permeační chromatografie (kolona: HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 75 pg), kde modře je znázorněna absorbance při 280 nm a červeně absorbance při 254 nm. B) Výsledek SDS-PAGE pro tři frakce nacházející se uprostřed největší hodnoty absorbance při 280 nm. Velikost příslušných proužků na gelu odpovídá teoretické velikosti 2A proteinu AiV (14,4 kDa).

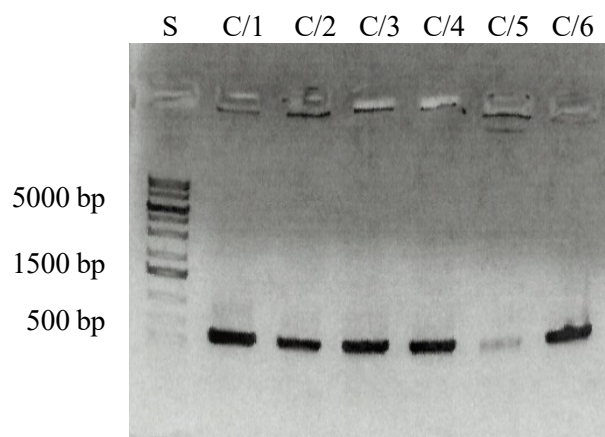
4.2 Příprava expresního plasmidu, exprese a purifikace rekombinantního proteinu 2A^{pro} CVB3

Byl navržen forwardní primer a reversní primer podle nukleotidové sekvence 2A proteinu u CVB3. Směs obou primerů společně s polymerasou Taq Mix Red a templátem DNA příslušného viru byla amplifikována metodou PCR. Teplota pro PCR byla nastavena podle teploty tání forwardní a reversního primeru. Elektroforetická pohyblivost produktu PCR reakce odpovídala sekvenci 2A proteinu (442 bp), viz obr. 11.



Obrázek 11. Horizontální agarosová elektroforesa pro produkt PCR. Směs použitá pro PCR reakci obsahovala DNA templát (1 : 1000), forwardní primer, reversní primer a polymerasu Taq Mix Red. Na gelu lze vidět proužek odpovídající amplifikované sekvenci pro 2A protein CVB3. S – standard, P2 – PCR produkt pro CVB3.

Byla vytvořena ligační směs stejně jako u AiV, ale amplifikovaný úsek pro 2A protein byl vložen do plasmidu pSumo. Tento vektorový konstrukt se sekvencí 2A proteinu byl transformován do kompetentních bakterií DH5 α dle postupu popsáno v kapitole 3.2.6, str. 30. Získané kolonie těchto bakterií byly použity do směsi pro PCR. Z kolonií bylo špičkou pipety přeneseno šest vzorků a pro CVB3 byl použit reversní primer pSumo. Forwardní primer zůstal stejný jako při první PCR reakci pro CVB3. Zda byl úsek pro 2A protein amplifikován, bylo zjištěno horizontální agarosovou elektroforesou, viz obr. 12, str. 41. Po vizualizaci agarosového gelu vidíme, že proužky odpovídají příslušné velikosti pro 2A protein CVB3. Pouze u jednoho vzorku nedošlo k amplifikaci úseku proteinu 2A^{pro} CVB3.



Obrázek 12. Horizontální agarosová elektroforesa pro produkty PCR z narostlých kolonií. Směs pro PCR obsahovala vždy část biomasy z označené kolonie, forwardní primer pSumo, reversní primer CVB3 a Taq polymerasu.

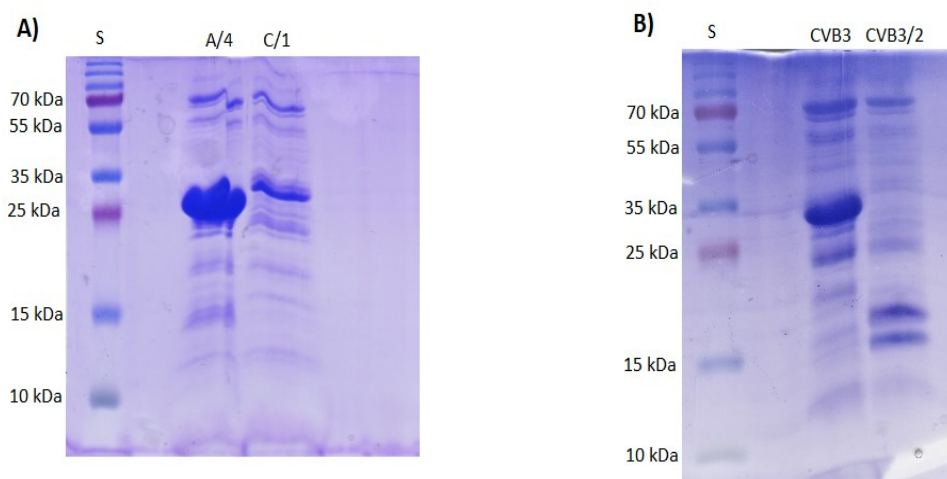
Vzorky byly kultivovány v tekutém médiu LB. Byla změřena absorbance při 260 nm pro zjištění koncentrace plasmidové DNA v purifikovaných vzorcích z tekutého média (viz tab. 10).

Tab. 10: Hodnoty absorbance plasmidové DNA při 260 nm.

Vzorky	Absorbance [ng/μL]
C/1	166,1
C/3	184,8
C/6	144,6

Dále byly vzorky vektorového konstruktů sekvenovány Sangerovou metodou. U jednoho vzorku byla zaznamenána mutace v sekvenci pro 2A protein. Pro expresi 2A proteinu CVB3 byl použit vzorek bez mutace a transformován do kompetentních bakterií *E. Coli* kmene BL21 Star podle postupu popsáno v kapitole 3.2.9, str. 33.

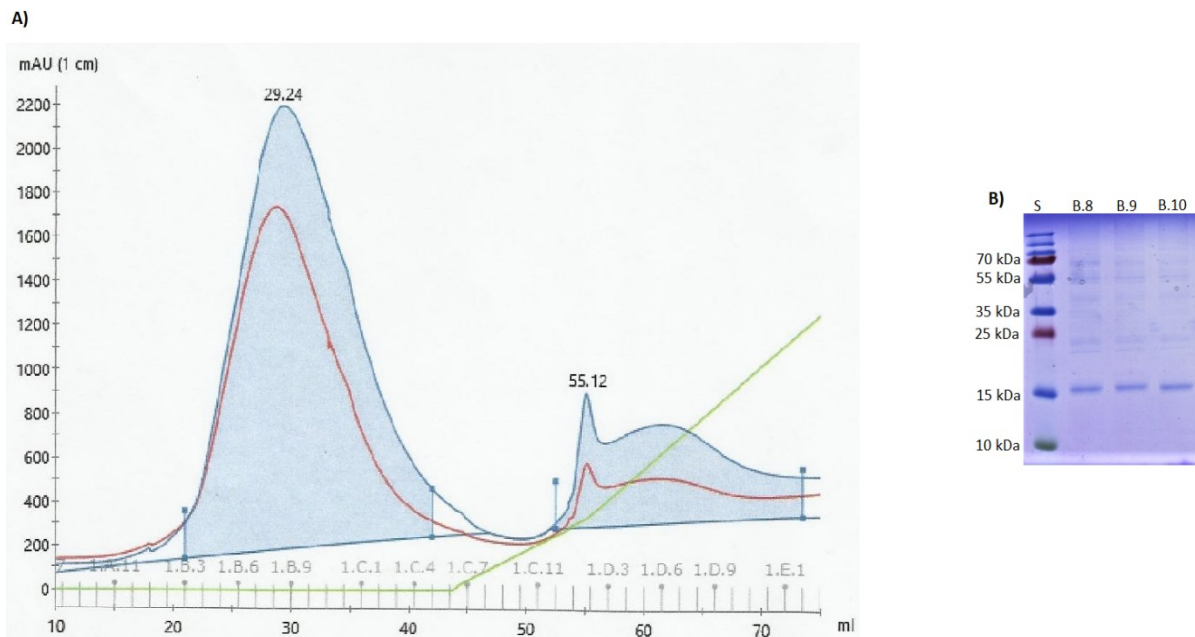
Poté, co byl 2A protein exprimován a izolován, došlo k jejich vizualizaci na elektroforese, viz obr. 13A. Nyní byla použita plastová kolona obsahující Ni-NTA agarosu. Protein 2A^{pro} byl purifikován na této koloně vsádkovou metodou. K odstranění histidinové kotvy byla použita Ulp1 proteasa. Vzorek byl uschován před štěpením a porovnán se vzorkem po štěpení Ulp1 proteasy. Na SDS elektroforese vidíme, že velikost štěpeného produktu odpovídá velikosti 2A proteinu CVB3 (16,2 kDa), viz obr. 13B.



Obrázek 13. SDS-PAGE pro izolaci a štěpení proteinu 2A^{pro} CVB3. A) Elektroforeza po afinitní chelatační chromatografii na plastové koloně. Jedná se o kontrolu izolace 2A proteinů. S – standard, A/4 – vzorek 2A proteinu A_iV, C/1 – vzorek 2A^{pro} CVB3. B) Elektroforeza po vložení Ulp1 proteasy do elučního pufru se zachyceným 2A proteinem. Vidíme, že došlo k odštěpení His kotvy společně se Sumo úsekem. S – standard, CVB3 – vzorek 2A^{pro} před štěpením, CVB3/2 – vzorek 2A^{pro} po štěpení.

Hodnota velikosti 2A proteinu CVB3 byla velmi blízko hodnotě štěpené histidinové kotvy. Z toho důvodu nebylo použito dialyzační střevo. Na AKTATM Pure byla zapojena odsolovací kolona, ta vyměnila pufr a postupně zvyšovala koncentraci imidazolu. Pro zachycení histidinové kotvy byla připojena druhá kolona HisTrap. Tímto byl 2A protein znovu purifikován na HisTrap koloně za účelem dalšího čištění proteinu a zbavení štěpené histidinové kotvy.

Na výsledném grafu vidíme první pík odpovídající oddělenému 2A proteinu od histidinové kotvy, viz obr. 14A, str. 43. Znovu byla provedena SDS elektroforeza pro tři frakce z prvního píku. Na gelu můžeme vidět proužky, které odpovídají velikost proteinu 2A^{pro} CVB3, tedy 16,2 kDa (viz obr. 14B, str. 43).



Obrázek 14. Průběh afinitní chromatografie a SDS-PAGE pro tři frakce z grafu.

A) Modře je znázorněna absorbance při 280 nm a červeně absorbance při 254 nm. Připojena byla kolona HiPrep™ 26/10 Desalting, která v podmínkách gradientové eluce zvyšovala koncentraci imidazolu. Druhá v pořadí byla zapojena kolona HisTrap™ Fast Flow (5 ml) pro oddělení histidinové kotvy. Tato kotva byla eluována jako poslední poté, co kolonou protekl 300mM imidazol. B) Elektroforesa pro tři frakce uprostřed prvního píku, ve kterém se nachází protein 2A^{pro} CVB3.

5 Diskuse

Cílem této práce bylo připravit rekombinantní 2A proteiny viru Aichi a CVB3. Pikornavirové 2A proteiny jsou obvykle virovými proteasami. Jednu z rolí 2A^{pro} představuje štěpení virového polyproteinu (prekurzoru) na menší proteiny, důležité pro replikaci a skládání viru. Kromě toho může 2A^{pro} štěpit i různé části hostitelské buňky a tím podpořit virovou infekci. Již v teoretickém úvodu jsme se zmínili např. o štěpení translačních faktorů (dochází k inhibici translace hostitelských proteinů), dále štěpení Bid proteinu pro spuštění apoptotické dráhy, štěpení Nups částí tvořící jadernou membránu (čímž blokují nukleo-cytoplasmatický transport) nebo štěpení dráhy pro tvorbu IFN-I (inhibice imunitní odpovědi hostitele).

Pro přípravu rekombinantních proteinů 2A^{pro} byla použita nukleotidová sekvence dvou virů – Aichi viru a Cocksackie viru B3. U obou virů se nachází 2A^{pro} s rozdílnou strukturou (především v aktivním místě) a také různými funkcemi. Nukleotidová sekvence 2A^{pro} byla vložena do dvou plasmidů s kanamycinovou rezistencí.

Nejdříve došlo k amplifikaci nukleotidové sekvence 2A^{pro} pomocí metody PCR. Použité primery obsahovaly i sekvence rozpoznávané příslušnými restrikčními endonukleasami. Byla vytvořena ligační směs, díky které byla vložena DNA (insert) do štěpených plasmidů (vektor). Poté byly transformovány expresní plasmidy se sekvencí proteinů 2A^{pro} do kompetentních bakterií *E. Coli*. Na expresi rekombinantních proteinů 2A^{pro} byly použity bakterie *E. Coli* kmen BL21 Star. Protein 2A^{pro} byl z buněk bakterií izolován a zachycen pomocí His kotvy na niklové koloně afinitní chromatografií. Byla provedena SDS-PAGE pro kontrolu izolace proteinů 2A^{pro}. Na obr. 9A, str. 38, můžeme vidět, že došlo k získání 2A proteinů spojených s His kotvou, jelikož velikosti odpovídají vypočtené hodnotě 2A proteinů s His kotvou pro oba viry. U Aichi viru se získalo větší množství rekombinantního proteinu 2A, tedy vzniklý proužek na gelu je větší.

Vzorek AiV byl štěpen TEV proteasou a vzorek CVB3 pomocí Ulp1 proteasy. Štěpené produkty vidíme na obr. 9B, str. 38 a na obr. 13B, str. 42. Velikosti těchto štěpených produktů proteinů 2A^{pro} bez His kotvy se shodují s vypočtenými hodnotami velikosti proteinů 2A^{pro} AiV a CVB3.

Štěpený rekombinantní protein 2A AiV byl přečištěn na gelové permeační chromatografii, kde bylo zaznamenáno vysoké množství rekombinantního proteinu 2A. U CVB3 byl štěpený 2A protein přečištěn znovu afinitní chromatografií a byl zaznamenán rekombinantní protein 2A^{pro} v podstatně menším množství.

6 Závěr

Cílem této práce byla příprava rekombinantních proteinů 2A viru Aichi a Coxsackie viru B3. Na základě příslušných výsledků můžeme prohlásit, že došlo k úspěšné přípravě obou rekombinantních proteinů 2A. Na začátku práce byl připraven expresní vektor pro bakteriální expresi 2A proteinů a následně došlo k izolaci a purifikaci rekombinantních proteinů 2A z AiV a CVB3.

Seznam použité literatury

1. Tselis, A.C. ed. (2014) *Neurovirology* (Elsevier, Edinburgh).
2. Payne, S. (2017) *Viruses* (Elsevier, Boston, MA) 1st edition.
3. Carter, J.B., Saunders, V.A. (2007) *Virology: principles and applications* (John Wiley & Sons, Chichester, England ; Hoboken, NJ).
4. Stanway, G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 2483–2501.
5. International Committee on Taxonomy of Viruses, King, A.M.Q. ed. (2012) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Academic Press, London ; Waltham, MA).
6. Ryu, W.-S. (2017) *Molecular virology of human pathogenic viruses* (Academic Press, an imprint of Elsevier, Amsterdam).
7. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–22.
8. Muslin, Kain, Bessaud, Blondel, Delpeyroux (2019) Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. *Viruses* **11**, 859.
9. Smyth, M.S. (2002) Picornavirus uncoating. *Mol. Pathol.* **55**, 214–19.
10. Bioscience Notes: *Picornavirus (Picornaviridae)*.
Dostupné z URL: <<https://www.biosciencenotes.com/picornavirus-picornaviridae/>> [cit. 22. 5. 2020].
11. Goulding, J., Imperial College London, UK. *Virus: Introduction*
Dostupné z URL: <<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/viruses-introduction>>.
12. Spear, A. (2009) *Protein requirements for the initiation of poliovirus negative-strand rna synthesis*. Dostupné z URL:
<<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.455.5857&rep=rep1&type=pdf>>.
13. Oh, H.S., Pathak, H.B., Goodfellow, I.G., Arnold, J.J., Cameron, C.E. (2009) Insight into Poliovirus Genome Replication and Encapsidation Obtained from Studies of 3B-3C Cleavage Site Mutants. *J. Virol.* **83**, 9370–87.
14. MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. ed. (2017) in *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)* (Academic Press, Boston), s 477–95.
15. Reuter, G., Boros, Á., Pankovics, P. (2011) Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* **21**, 32–41.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), *Genus: Kobuvirus*.
Dostupné z URL:
<https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/686/genus-kobuvirus> [cit. 22. 5. 2020].
17. Khamrin, P., Maneekarn, N., Okitsu, S., Ushijima, H. (2014) Epidemiology of human and animal kobuviruses. *VirusDisease* **25**, 195–200.

18. Sasaki, J., Nagashima, S., Taniguchi, K. (2003) Aichi Virus Leader Protein Is Involved in Viral RNA Replication and Encapsidation. *J. Virol.* **77**, 10799–807.
19. Sabin, C., Füzik, T., Škubník, K., Pálková, L., Lindberg, A.M., Plevka, P. (2016) Structure of Aichi Virus 1 and Its Empty Particle: Clues to Kobuvirus Genome Release Mechanism. *J. Virol.* **90**, 10800–810.
20. Nikonov, O.S., Chernykh, E.S., Garber, M.B., Nikonova, E.Yu. (2017) Enteroviruses: Classification, diseases they cause, and approaches to development of antiviral drugs. *Biochem. Mosc.* **82**, 1615–31.
21. Visser, L.J., Langereis, M.A., Rabouw, H.H., Wahedi, M., Muntjewerff, E.M., de Groot, R.J., van Kuppeveld, F.J.M. (2019) Essential Role of Enterovirus 2A Protease in Counteracting Stress Granule Formation and the Induction of Type I Interferon. *J. Virol.* **93** (10), e00222-19.
22. Chau, D.H.W., Yuan, J., Zhang, H., Cheung, P., Lim, T., Liu, Z., Sall, A., Yang, D. (2007) Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* **12**, 513–24.
23. Maghsoudi, N., Khodagholi, F., Sadjadi, M., Zeinodini, M., Sabbaghian, M. (2008) Purification and partial characterization of coxsackievirus B3 2A protease expressed in Escherichia coli. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**, 238–44.
24. Yang, X., Cheng, A., Wang, M., Jia, R., Sun, K., Pan, K., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Chen, S., Liu, M., Zhao, X.-X., Chen, X. (2017) Structures and Corresponding Functions of Five Types of Picornaviral 2A Proteins. *Front. Microbiol.* **8**, 1373.
25. Baxter, N.J., Roetzer, A., Liebig, H.-D., Sedelnikova, S.E., Hounslow, A.M., Skern, T., Waltho, J.P. (2006) Structure and Dynamics of Coxsackievirus B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease. *J. Virol.* **80**, 1451–62.
26. Hughes, P.J., Stanway, G. (2000) The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation. *J. Gen. Virol.* **81**, 201–7.
27. Muto, S., Miyoshi, H., Nishikawa, H., Nakashima, H. (2006) Novel recognition sequence of coxsackievirus 2A proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1436–42.
28. Castelló, A., Álvarez, E., Carrasco, L. (2011) The Multifaceted Poliovirus 2A Protease: Regulation of Gene Expression by Picornavirus Proteases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 1–23.
29. Wang, L., Xie, W., Zhang, L., Li, D., Yu, H., Xiong, J., Peng, J., Qiu, J., Sheng, H., He, X., Zhang, K. (2018) CVB3 Nonstructural 2A Protein Modulates SREBP1a Signaling via the MEK/ERK Pathway. *J. Virol.* **92** (24), e01060-18.
30. Sasaki, J., Taniguchi, K. (2008) Aichi Virus 2A Protein Is Involved in Viral RNA Replication. *J. Virol.* **82**, 9765–69.
31. QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook.
32. QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook.
33. Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B. (2014) Protein Expression and Purification. *Klin. Onkol.* **27**, S92–98.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Tab. 11: Evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka